

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
(Leiter: Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein)

DER EINFLUSS VON DEXTRANSULFAT AUF DAS
IMMUNOLOGISCHE GEDÄCHTNIS

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Dietrich Theden
aus Konstanz

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
(Leiter: Professor Dr.rer.nat. Tibor Diamantstein)

DER EINFLUSS VON DEXTRANSULFAT AUF DAS
IMMUNOLOGISCHE GEDÄCHTNIS

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Dietrich Theden
aus Konstanz

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Michael Gross

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 28. Juni 1973

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung	3
3.	Material und Methoden	4
3.1.	Tiermaterial	4
3.2.	Polyanion	4
3.3.	Antigen	4
3.4.	Komplement	4
3.5.	Seren	5
3.6.	Medium	5
3.7.	Agarose	5
3.8.	Objektträger	6
3.9.	Immunisierung	6
3.10.	Vorbehandlung (Priming) und Milzzelltransfer	6
3.11.	Bestimmung der Anzahl der antikörperbildenden Zellen (PFC) in der Milz der Rezipienten	7
3.12.	Bestimmung der hämolysierenden und agglutinierenden Antikörpertiter	8
3.12.1.	Bestimmung der Hämolysintiter	9
3.12.2.	Bestimmung der Hämagglutinintiter	9
3.13.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	9

		Seite
4.	Ergebnisse	10
4.1.	Die Wirkung von Dextransulfat auf die Aktivität von Gedächtniszellen in der Milz	10
4.2.	Abhängigkeit des immunologischen Gedächtnisses von der Zeitspanne zwischen Primärimmunisierung und Milzzelltransfer	16
5.	Zusammenfassung und Diskussion	24
6.	Literaturverzeichnis	29

1. Einleitung

Injiziert man einem Versuchstier ein Antigen, so steigt der Antikörpertiter nach der ersten Injektion langsamer an und erreicht meist auch niedrigere Maximalwerte als nach einer zweiten Injektion. Bei der Primärreaktion kann man beobachten, daß nach einer kurzen Verzögerungsphase (~ 12 h) die Zahl der 19 S- antikörperbildenden (IgM) Zellen exponentiell ansteigt und nach vier Tagen langsam wieder abfällt. Bei den 7 S- antikörperbildenden (IgG) Zellen dagegen ist die Verzögerungsphase länger, der Abfall der Immunantwort aber nicht so abrupt (13).

Die Sekundärantwort zeichnet sich dadurch aus, daß der Ausstoß von 19 S- Antikörpern meist größer und schneller ist. Bei den 7 S- Antikörpern ist der Unterschied zwischen Primär- und Sekundärreaktion noch gravierender; die Menge der 7 S- antikörperbildenden Zellen ist bei der Sekundärreaktion viel größer und die Bildung der Antikörper hält wesentlich länger an als bei der Primärreaktion (13).

Dieser Unterschied zwischen der Primär- und Sekundärreaktion beruht auf dem Vorhandensein eines "immunologischen Gedächtnisses" (14, 19, 22). Gleichzeitig mit der Bildung von antikörperbildenden Zellen bei der Primärimmunisierung müssen also auch Gedächtniszellen (memory cells) entstanden sein. Der Mechanismus der Bildung von Gedächtniszellen und die Spezifität ihrer Induktion ist noch nicht ganz geklärt.

Eine der Hypothesen (29) besagt, daß sich aus einer für eine Antigen determinante spezifischen Zelle, der sog. X-Zelle, durch Kontakt mit einem korrespondierenden Antigen, mehrere spezifische Y-Zellen ableiten, die sich dann weiter zu Z-Zellen differenzieren. Die Z-Zelle ist die eigentliche antikörperbildende Zelle. Die Y-Zelle ist in diesem Modell die Gedächtniszelle, welche selbst keine Antikörper bildet, sich aber zur Z-Zelle differenzieren kann, wenn sie mit einem entsprechenden Antigen wieder in Kontakt kommt.

Untersuchungen haben gezeigt, daß bei der humoralen Immunantwort gegenüber dem überwiegenden Teil von Antigen zwei verschiedene Arten von Lymphozyten mitwirken müssen, und zwar "bursaäquivalente" (B-Zellen) und "thymusabhängige" (T-Zellen) Zellen (3,4,5,20,21,30). Nachgewiesen ist, daß sowohl in der T-Zellpopulation als auch in der B-Zellpopulation nach der Primärimmunisierung Gedächtniszellen vorhanden sind (22,23,24). Wahrscheinlich spielt das T-Zell-Gedächtnis eine quantitative und qualitative, das B-Zell-Gedächtnis mehr eine quantitative Rolle (17).

Polynukleotide sollen Gedächtniszellen u.a. stimulieren, sich in antikörperbildende Zellen zu differenzieren (1,2,16). Die Adjuvanswirkung der Polyanionen soll z.T. auf dem gleichen Prinzip beruhen (10).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Polyanionen unter bestimmten Bedingungen in vivo auch die Sekundärantwort erhöhen (7,11,12,18). Die Wirkung von Polyanionen auf das

immunologische Gedächtnis scheint demnach widersprüchlich zu sein.

Wenn man davon ausgeht, daß Polyanionen tatsächlich Gedächtniszellen stimulieren, sich zu antikörperbildenden Zellen weiter zu differenzieren, so müßte man vermuten, daß sie die Sekundärantwort eher unterdrücken als fördern.

2. Aufgabenstellung

In einem adaptiven Transfersystem soll geprüft werden, inwieweit Polyanionen einen Einfluß auf den "memory-cell-pool" ausüben. Als Polyanion wurde Dextransulfat, eines der potentesten Adjuvantien dieser Gruppe, verwendet (12).

3. Material und Methoden

3.1. Tiermaterial

Versuchstiere waren C 57/B1/6J Mäuse der Animal Division, Dr. Cw. Friis, Kopenhagen, weiblichen Geschlechts, die mit Altromin R 10 Standardfutter ernährt wurden. Zum Zeitpunkt der Primärimmunisierung waren sie sechs bis acht Wochen, bei Milzzelltransfer acht bis zehn Wochen alt.

3.2. Polyanion

Als Polyanion wurde Dextransulfat (DS) mit dem Molekulargewicht 5×10^5 der Fa. Serva Heidelberg verwendet. DS gilt als eines der am besten untersuchten und potentesten Adjuvantien dieser Gruppe (12).

3.3. Antigen

Als Antigen wurden Hammelerythrozyten (SRBC) der Fa. Behring-Werke, Marburg benutzt. Vor Injektion wurden sie dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend durch Auszählen in einer Zählkammer und entsprechendes Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

3.4. Komplement

Meerschweinchenkomplement wurde von den Behring-Werken, Marburg bezogen.

3.5. Seren

Antimaus- γ -globulinserum (AMG, Behring-Werke) und Normales Kaninchenserum (NS, Fa. Difco), zur Entwicklung von 7S-antikörperbildenden Zellen, wurde vor Gebrauch, um natürliche hämolysierende Antikörper zu entfernen, mit SRBC adsorbiert. Die Adsorption erfolgte durch Inkubation mit gleichen Volumina gepackter SRBC eine Stunde bei 4° C. Die nach der anschließenden Zentrifugation anfallenden Überstände kamen zur Anwendung.

3.6. Medium

Das Medium wurde aus Eagle's Minimum Essential Medium mit Hanks Salze (Kat.Nr. 47365 Fa. Serva) hergestellt (MEM). Dabei wurden 10,7 g MEM Trockensubstanz in 800 ml Phosphatpuffer gelöst (hypertone MEM) und mit aqua dest. auf 1.000 ml aufgefüllt (isotone MEM). Der Phosphatpuffer bestand aus 358 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ und 200 mg $\text{MgCl}_2 \times 16 \text{ H}_2\text{O}$ in 1.000 ml aqua dest. gelöst.

3.7. Agarose

Im kochenden Wasserbad wurden 250 mg Agarose (L' Industrie Biologique Francaise) eine halbe Stunde in 10 ml aqua dest. gelöst. Dieser Lösung wurden anschließend 40 ml auf 50° C angewärmte hypertone MEM zugesetzt und somit Isotonie erreicht.

3.8. Objektträger

Die Objektträger wurden mit aqua dest. gewaschen, anschließend mit 95%-igem Alkohol gereinigt und danach durch Eintauchen in eine 0,1%-ige wässrige heiße Agaroselösung beschichtet. Die Trocknung erfolgte 1 Stunde bei 90⁰ C.

3.9 Immunisierung

Zur Immunisierung wurde den Mäusen die gewünschte Menge SRBC intraperitoneal, in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, injiziert.

3.10. Vorbehandlung (Priming) und Milzzelltransfer

Sechs bis acht Wochen alten C 57/Bl/6J Mäusen wurden entweder eine SRBC-Suspension (2×10^6) oder eine SRBC-Suspension (2×10^6) und 1 mg DS eine halbe Stunde vor Antigen-gabe intraperitoneal injiziert. Eine dritte Gruppe von Mäusen, die keinerlei Injektion erhielt, diente als Kontrolle. Die einzelnen Versuchsgruppen bestanden aus 7 Tieren. 10, 21 und 42 Tage nach Immunisierung wurden die Tiere (also SRBC-Gruppe, SRBC + DS-Gruppe sowie Kontrollgruppe) durch Halswirbelloxation getötet. Die Milzen wurden herauspräpariert und alle Milzen einer Gruppe gemeinsam in isotoner MEM vorsichtig mit einer Pinzette aus den Kapseln befreit und suspendiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erreichen, wurden die Milzzellsuspensionen durch eine Kanüle Nr. 14 aspiriert und anschließend durch ein 100 mash Stahlsieb filtriert.

Die Konzentration der Milzzellsuspensionen wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt und dann durch Verdünnen mit isotoner MEM auf die für die Übertragung gewünschte Konzentration eingestellt (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7).

Die für den Zelltransfer bestimmten acht bis zehn Wochen alten Empfängertiere wurden mit einer subletalen Dosis von 600 r (80 r/min) bestrahlt. Ein bis zwei Stunden nach der Bestrahlung wurde ihnen die Milzzellsuspension gemischt mit 4×10^8 SRBC (Gesamtvolumen 0,3 ml) intravenös in die vena caudalis injiziert.

3.11. Bestimmung der Anzahl antikörperbildender Zellen (PFC) in der Milz der Rezipienten (15)

Die Rezipienten wurden 7 Tage nach Milzzelltransfer mit Äther narkotisiert, dekapitiert und entblutet. Die Milzen wurden vorsichtig entfernt, gewogen und in isotoner MEM mit einer Pinzette grob suspendiert. Durch 3-4 maliges Aufziehen mit einer Spritze (Kanüle Nr.14) wurde eine Einzelzellsuspension angestrebt, die anschließend durch ein 100 mash Stahlsieb filtriert wurde. Die Zubereitung der Milzzellsuspension erfolgte bei 4°C .

0,25 ml Agaroselösung, 20 μl 20%-ige SRBC-Suspension und eine variable Menge (20 oder 50 μl) Milzzellsuspension wurden in der vorgenannten Reihenfolge in auf 47°C im Wasserbad erwärmte Reagenzgläser einpipettiert, durch Schütteln gemischt und schnell auf den vorbehandelten Objektträger ausgestrichen.

Nach ein bis zwei Minuten erhärtete die Agaroselösung mit

den Zellsuspensionen, so daß die Objektträger mit MEM überschichtet und eineinhalb Stunden bei 37° C inkubiert werden konnten.

Da direkte 19 S und indirekte 7 S antikörperbildende Zellen bestimmt werden sollten, wurden 4 Objektträger pro Milz-zellsuspension beschichtet.

Die Platten zur Bestimmung der 19 S- PFC wurden eine Stunde mit NS im Verhältnis 1 : 150 mit MEM inkubiert, während die Platten zur Bestimmung der Summe der 19 S + 7 S- PFC mit polyvalentem AMG in einer 1 : 250-fachen Verdünnung mit MEM ebenfalls eine Stunde bei 37° C inkubiert wurden.

Nach diesen Maßnahmen wurden alle Objektträger mit einer komplementhaltigen MEM, bestehend aus einem Teil Komplement und vier Teilen MEM, überschichtet und eine Stunde bei 37° C inkubiert.

Die Zählung der PFC, sichtbar durch gebildete Hämolysehöfe, erfolgte mit dem Placont Gerät.

Für jede Versuchseinheit, also Bestimmung der 19 S oder 19 S + 7 S antikörperbildenden Zellen, wurden die Objektträger in doppelter Ausführung beschichtet und ausgewertet.

3.12. Bestimmung der hämolysierenden und agglutinierenden Antikörpertiter

Aus den gewonnenen Seren der Tiere wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Um die 7 S Antikörpertiter zu bestimmen, wurde den einzelnen 1 : 4 verdünnten Seren (0,2 ml) 0,2 ml

einer 0,1 molaren Mercaptoäthanollösung zugesetzt und bei 37° C dreißig Minuten inkubiert. Hierdurch werden die 19 S-Antikörper zerstört. Anschließend wurde auch hiervon eine Verdünnungsreihe hergestellt.

3.12.1. Bestimmung der Hämolsintiter (25)

Den Verdünnungsreihen der Seren (0,2 ml) wurden 0,2 ml eines SRBC-Komplementgemisches zugesetzt, welches aus einer 1%-igen SRBC-Suspension, 1 : 1 gemischt mit 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Komplement, bestand.

Nach einer Stunde bei 37° C im Brutschrank wurden die Titer abgelesen. Der reziproke Wert der Serumverdünnung bei dem eine vollständige Hämolyse der SRBC eingetreten ist, wird als Hämolsintiter bezeichnet.

3.12.2. Bestimmung der Hämagglutinintiter (25)

Um ihr Eigenkomplement zu zerstören, wurden die Seren dreißig Minuten bei 56° C inaktiviert. Den Verdünnungsreihen der Seren (0,2 ml) wurde 0,2 ml einer 0,5%-igen SRBC-Suspension zugesetzt und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung, bei dem ein Agglutinationsmuster von +1 nach Stavitsky (28) auftritt, wird als Agglutinintiter bezeichnet.

3.13. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt (26).

4. Ergebnisse

4.1. Die Wirkung von DS auf die Aktivität von Gedächtnis- zellen in der Milz

Um herauszufinden, ob die Anzahl oder Aktivität der Gedächtniszellen in der Milz durch ein Polyanion beeinflusst werden kann, sind Gruppen von Mäusen entweder mit Antigen allein oder mit Antigen und Polyanion primär immunisiert worden.

Die Milzzellen dieser Tiere sind mit steigender Konzentration auf bestrahlte Rezipienten zusammen mit einer optimalen Antigendosis überimpft worden.

Sieben Tage nach diesem Zelltransfer ist die Immunantwort in den Rezipienten bestimmt worden.

Die Versuchsanordnung ist aus Abbildung 1a ersichtlich.

Abb. 1a Versuchsschematik zu 4.1

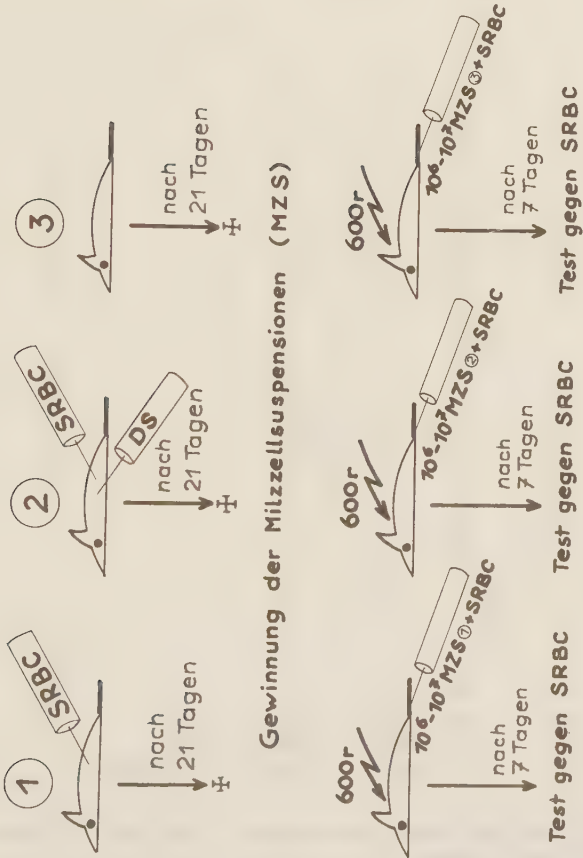
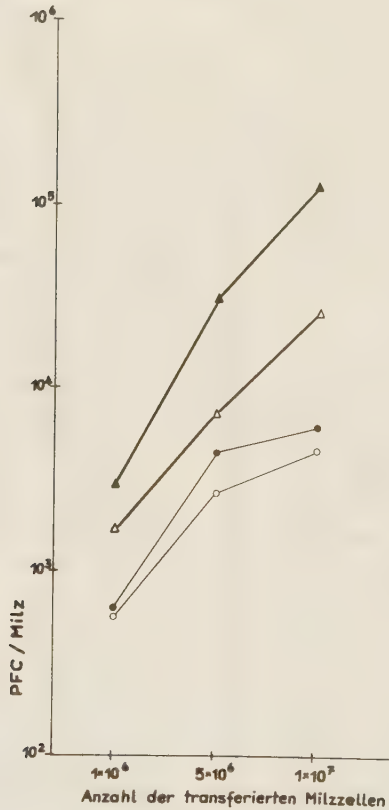


Abb. 1b Abhängigkeit der Immunantwort von der Anzahl der transferierten Milzzellen. "Priming" erfolgte entweder mit Antigen und DS oder nur mit Antigen.



Bestimmung der antikörperbildenden Zellen sieben Tage nach Milzzelltransfer

- ▲ 19S+7S behandelt mit SRBC+DS bei Primärimmunisierung
- △ 19S behandelt mit SRBC+DS bei Primärimmunisierung
- 19S+7S behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung
- 19S behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung

Tab. 1 PFC/Milz in Rezipienten (7 Tage nach Transfer)

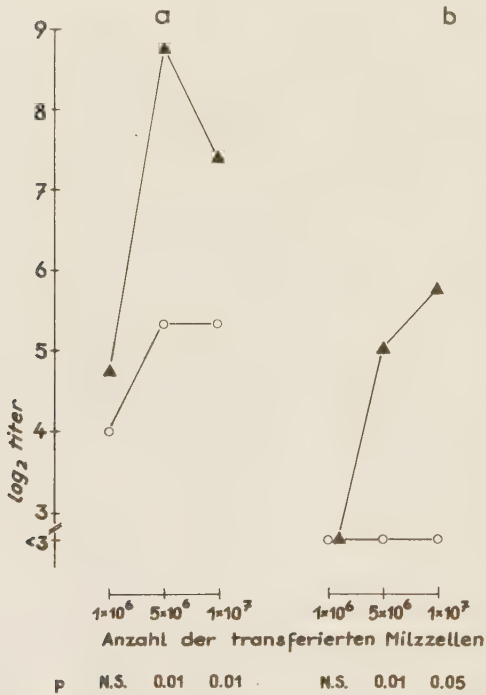
In Rezipienten transferierte Anzahl von Milzzellen	1×10^6		5×10^6		1×10^7	
	19S+7S	19S	19S+7S	19S	19S+7S	19S
A	630 (105-1500)	570 (170-2000)	4500 (750-14000)	2758 (760-8500)	6150 (2220-10000)	4606 (2400-6400)
B	3000 (600-7500)	1680 (560-1800)	30500 (15000-45000)	7210 (5100-10900)	123000 (84000-210000)	25700 (11700-51000)
p A/B	0,1	0,05	0,01	0,02	0,01	0,01

A behandelt mit SRBC bei Priming

B behandelt mit SRBC und DS bei Priming

() Schwankungsbreite und Signifikanzberechnung

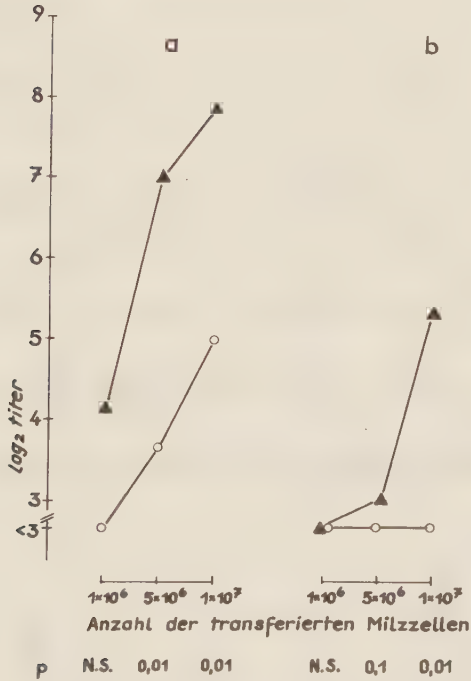
Abb. 1c Abhängigkeit der Immunantwort von der Anzahl der transferierten Milzzellen. "Priming" erfolgte entweder mit Antigen und DS oder nur mit Antigen.



Bestimmung der gegen SRBC gerichteten Hämagglutininintiter sieben Tage nach Milzzelltransfer

- ▲ behandelt mit SRBC + DS bei Primärimmunisierung
- behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung
- a = 19S + 7S b = 7S

Abb. 1d Abhängigkeit der Immunantwort von der Anzahl der transferierten Milzzellen. "Priming" erfolgte entweder mit Antigen und DS oder nur mit Antigen.



Bestimmung der gegen SRBC gerichteten Hämolytintiter sieben Tage nach Milzzelltransfer.

- ▲ behandelt mit SRBC + DS bei Primärimmunisierung
- behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung

a = 19S + 7S b = 7S

4.2. Abhängigkeit des immunologischen Gedächtnisses von der Zeitspanne zwischen Primärimmunisierung und Milzzelltransfer

Versuchsgruppen von Mäusen, die aus 21 Tieren bestanden , wurde 2×10^6 SRBC intraperitoneal sowie 2×10^6 SRBC und eine halbe Stunde vor Antigengabe 1 mg DS intraperitoneal injiziert. Eine dritte Gruppe, die weder Antigen noch DS erhielt, diente als Kontrolle.

Jeweils sieben Tiere aus den oben genannten Gruppen sind 10, 21 und 42 Tage später getötet worden.

Eine konstante Zahl von Milzzellen (1×10^7) ist mit Antigen gemischt in subletal bestrahlte Rezipienten intravenös injiziert worden.

Sieben Tage später wurde die Immunantwort in den Rezipienten gemessen.

Die Versuchsanordnung geht aus Abbildung 2a hervor.

Abb. 2a Versuchsschematik zu 4.2.

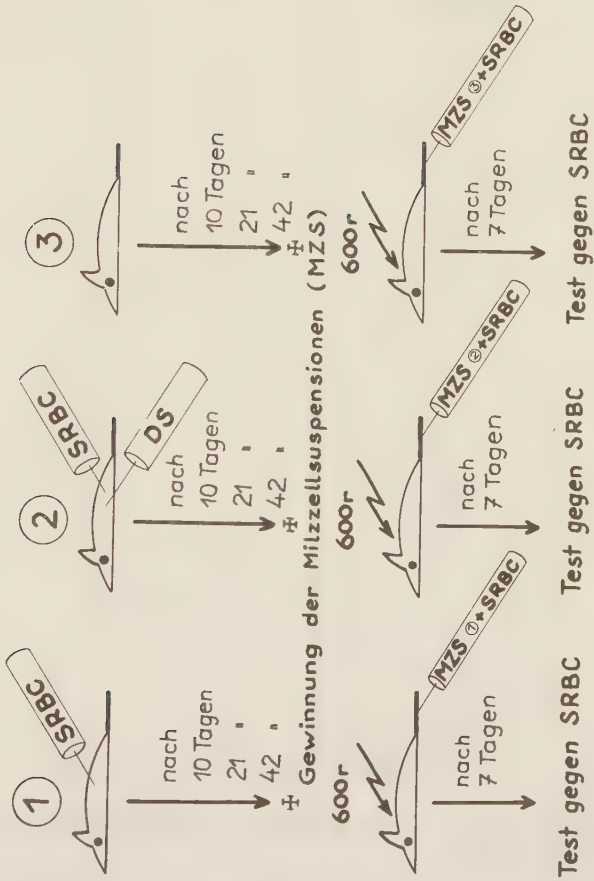
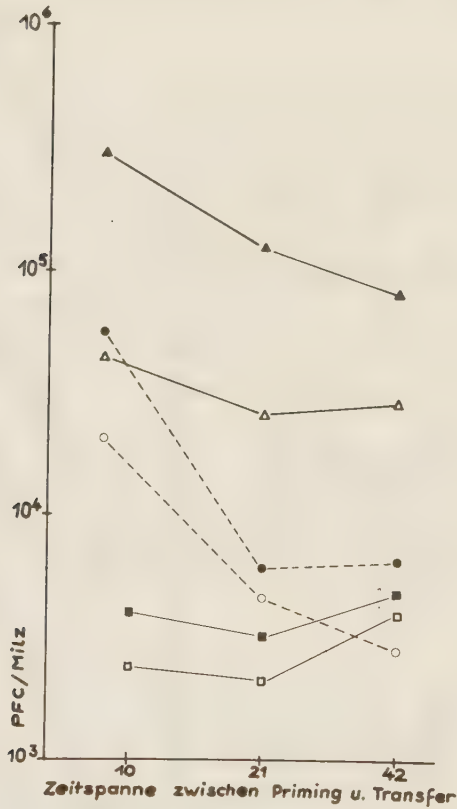


Abb. 2b Abhängigkeit der Immunantwort von der Zeitspanne zwischen Priming und Milzzelltransfer



Bestimmung der antikörperbildenden Zellen sieben Tage nach Milzzelltransfer

- ▲ 19S + 7S behandelt mit SRBC + DS bei Primärimmunisierung
- △ 19S behandelt mit SRBC + DS bei Primärimmunisierung
- 19S + 7S behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung
- 19S behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung
- 19S + 7S unbehandelt
- 19S unbehandelt

Tab. 2a PFC/Milz in Rezipienten x

Zeit zwischen Vorbehandlung u. Zelltransfer	10 Tage			21 Tage			42 Tage		
	19S+7S	19S	19S+7S	19S	19S+7S	19S	19S+7S	19S	19S
A	57500 (13500-151000)	20300 (6700-46200)	6050 (2700-10500)	4600 (2420-6460)	6600 (3300-14500)	2800 (740-4800)			
B	300000 (17800-395000)	40400 (33200-59000)	123000 (84000-210000)	25700 (11700-52200)	81000 (30500-285000)	28500 (6100-117200)			
C	4050 (1700-7400)	2400 (1100-3800)	3200 (1600-6600)	2090 (600-3440)	4800 (1050-13200)	3992 (760-10480)			

() Schwankungsbreite x 1×10^7 Milzzellen transferiert

A behandelt mit SRBC bei Priming

B behandelt mit SRBC und DS bei Priming

C unbehandelt

Tab. 2b Signifikanzberechnungen

	10 Tage		21 Tage		42 Tage	
	19S+7S	19S	19S+7S	19S	19S+7S	19S
p A/B	0,01	0,1	0,01	0,01	0,01	0,01
p A/C	0,01	0,01	N.S.	0,02	N.S.	N.S.
p B/C	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05

	A		B		C	
	19S+7S	19S	19S+7S	19S	19S+7S	19S
p 10/21 ⁺	0,02	0,02	0,1	0,05	N.S.	N.S.
p 21/42	N.S.	N.S.	0,05	N.S.	N.S.	N.S.
p 10/42	0,01	0,01	0,01	0,02	N.S.	N.S.

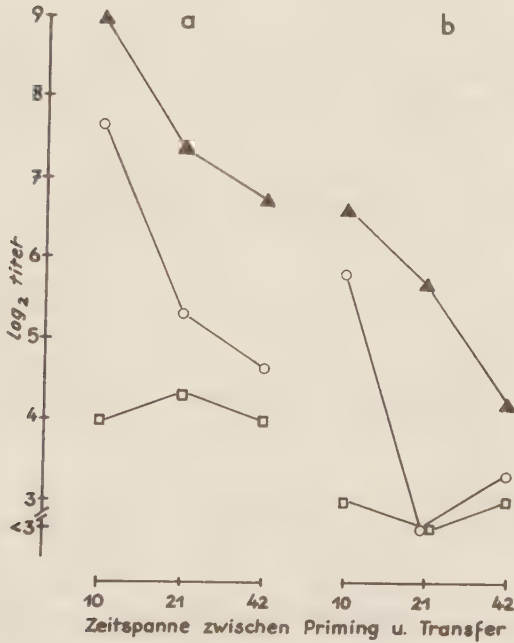
A behandelt mit SRBC bei Priming

B behandelt mit SRBC und DS bei Priming

C unbehandelt

+ Zeit zwischen Vorbehandlung und Zelltransfer

Abb. 2c Abhängigkeit der Immunantwort von der Zeitspanne zwischen Priming und Milzzelltransfer



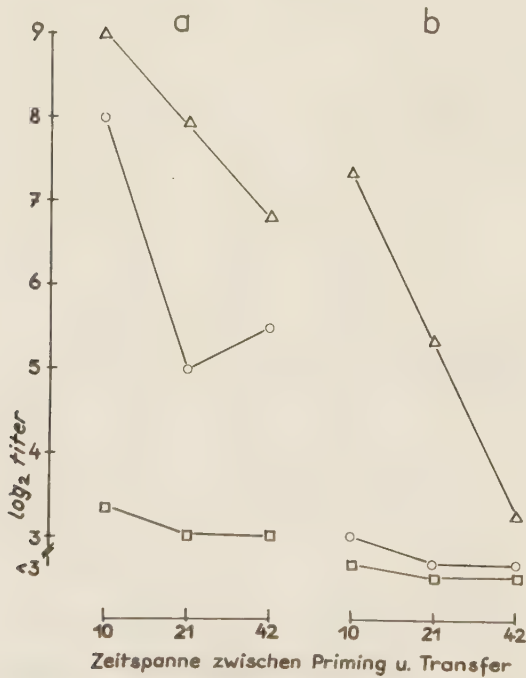
Bestimmung der gegen SRBC gerichteten Hämagglutininintiter sieben Tage nach Milzzelltransfer.

- ▲ behandelt mit SRBC + DS bei Primärimmunisierung
- behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung
- unbehandelt

a = 19S + 7S

b = 7S

Abb. 2d Abhängigkeit der Immunantwort von der Zeitspanne zwischen Priming und Milzzelltransfer.



Bestimmung der gegen SRBC gerichteten Hämolytintiter sieben Tage nach Zelltransfer

- Δ behandelt mit SRBC + DS bei Primärimmunisierung
- behandelt mit SRBC bei Primärimmunisierung
- unbehandelt

a = 19S + 7S b = 7S

Tab. 2c Signifikanzberechnung

	10 Tage		21 Tage		42 Tage	
	19S+7S	7S	19S+7S	7S	19S+7S	7S
p A/B	N.S.	N.S.	0,01	0,02	0,05	0,1
p A/C	0,01	0,01	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
p B/C	0,01	0,01	0,01	0,05	0,05	N.S.

A behandelt mit SRBC bei Priming

B behandelt mit SRBC und DS bei Priming

C unbehandelt

Tab. 2d Signifikanzberechnung

	10 Tage		21 Tage		42 Tage	
	19S+7S	7S	19S+7S	7S	19S+7S	7S
p A/B	N.S.	0,01	0,01	0,01	0,05	0,1
p A/C	0,01	N.S.	0,02	N.S.	0,1	N.S.
p B/C	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02

5. Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Polyanionen einen Einfluß auf das immunologische Gedächtnis bei Mäusen haben.

Dextransulfat, dessen stimulierender Einfluß auf die humorale Immunantwort bei der Maus erwiesen ist, diente als polyanionisches Adjuvans.

Nach den Vorstellungen von Braun (1,2) soll die Wirkung der Polyanionen u.a. darauf zurückzuführen sein, daß sich aus Gedächtniszellen verstärkt antikörperbildende Zellen differenzieren.

Sollte diese Vorstellung zutreffen, müßte man bei Immunisierung mit Antigen und Polyanion zwar eine erhöhte Anzahl antikörperbildender Zellen, aber ein erniedrigtes immunologisches Gedächtnis erwarten.

Um diese Fragen zu klären, bediente man sich folgender Versuchsanordnung:

Eine Versuchsgruppe wurde mit einer suboptimalen Dosis SRBC allein, eine zweite mit einer suboptimalen Dosis SRBC und DS immunisiert. Nach einundzwanzig Tagen sind die Milzzellen dieser Tiere in steigender Konzentration auf subletal bestrahlte Rezipienten übertragen worden (die Rezipienten selbst sind bis vierzehn Tage nach Bestrahlung nicht in der Lage Antikörper gegen SRBC zu bilden). Nach sieben Tagen wurde die Immunantwort in den Empfängertieren bestimmt.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, kommt es lediglich zu

einer typischen Sekundärantwort, wenn man eine adäquate Menge Milzzellen von den Donoren auf die bestrahlten Rezipienten überträgt und auch nur dann, wenn man bei der Primärimmunisierung DS mitgespritzt hat.

Demnach scheint sich bei der Primärimmunisierung nur dann ein ausgeprägtes immunologisches Gedächtnis herauszubilden, wenn man zu der suboptimalen Antigendosis ein Adjuvans hinzugibt.

Nach der eingangs angeführten Vorstellung von Braun (1,2) hätte man erwarten müssen, daß durch Polyanionen die Sekundärantwort eher unterdrückt als gefördert wird. Dieser Versuch zeigte hingegen, daß Polyanionen nicht nur die Anzahl antikörperbildender Zellen erhöhen, sondern auch auf das immunologische Gedächtnis einen positiv stimulierenden Effekt ausüben.

Spiesel und Gershon (27) haben herausgefunden, daß man bei einer niedrigen Antigendosis (1×10^7 SRBC) zwar ein immunologisches Gedächtnis nachweisen kann, welches aber nur sehr kurzfristig ist. Sie stellten fest, daß nach 10 Tagen immunologisches Gedächtnis zu beobachten war, aber nach 21 und noch ausgeprägter nach 42 Tagen konnten mit einer niedrigen Antigendosis immunisierte Mäuse gegenüber einer Zweitimmunisierung keine oder nur eine stark verringerte Immunantwort geben. Diese Reaktion war mit einer Primärantwort vergleichbar.

Sie haben auch festgestellt, daß es unter diesen Bedingungen zu keiner Erhöhung der DNS-Synthese kommt, sondern daß dieses

"Kurzzeitgedächtnis" ohne Proliferation von Zellen einhergeht.

Andererseits haben sie gefunden, daß man bei Injektion einer hohen Antigendosis (4×10^8 SRBC) nach zehn Tagen kein immunologisches Gedächtnis in den Mäusen nachweisen kann, obwohl es dabei zu einer starken Erhöhung der DNS-Synthese gekommen ist. Testet man das immunologische Gedächtnis 21 oder 42 Tage nach Primärimmunisierung, so kann man feststellen, daß sich ein ausgeprägtes immunologisches Gedächtnis entwickelt hat.

Aus diesen Befunden muß man schließen, daß es einen Unterschied zwischen einem "immunologischen Kurzzeitgedächtnis", wie es sich bei niedriger Antigendosis entwickelt, und einem "immunologischen Langzeitgedächtnis", welches man nach hoher Antigendosis beobachten kann, gibt.

Um den Einfluß von Polyanionen auf das Kurz- und Langzeitgedächtnis zu klären, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Mit Antigen, Antigen und Polyanion und unbehandelte Versuchsgruppen wurden 10, 21 und 42 Tage nach Immunisierung getötet. Die gewonnenen Milzzellsuspensionen der einzelnen Gruppen wurden auf subletal bestrahlte Rezipienten übertragen. Die Immunantwort der Rezipienten wurde sieben Tage nach Milzzelltransfer untersucht.

In den vorliegenden Versuchen ließ sich zeigen, daß sich schon bei einer sehr kleinen Antigendosis (eine Zehnerpotenz unter der von Spiesel und Gershon verwendeten) bei Zugabe von Adjuvans ein ausgeprägtes Kurzzeitgedächtnis entwickelt. Aber auch ein Langzeitgedächtnis, wenn auch etwas erniedrigt,

war nachweisbar. Daraus muß geschlossen werden, daß durch Polyanionen sowohl ein Kurzzeit- als auch ein Langzeitgedächtnis erzeugt worden ist.

Nach Diamantstein et al. (6) wird durch die Gabe von Polyanionen vor Immunisierung vermehrt Antigen in der Milz aufgenommen (ca. 10 x soviel wie nach Antigen-Injektion allein). Demnach wäre eine Verbesserung des immunologischen Gedächtnisses nach Polyanioninjektion allein durch die Erhöhung der Antigenaufnahme in den lymphatischen Geweben denkbar.

Nachdem 2×10^6 SRBC injiziert wurden, könnte man erwarten, daß ca. 2×10^7 SRBC die Milz nach Behandlung mit Polyanionen erreichen. Diese Antigenmenge, welche der von Spiesel und Gershon entspräche, dürfte zwar ausreichen, um ein Kurzzeit-Gedächtnis, keineswegs aber um ein Langzeit-Gedächtnis zu erzeugen.

Demnach müssen wir annehmen, daß die erhöhte Antigen-Konzentration in der Milz zur Erklärung des Effektes von DS auf den "memory-cell-pool" nicht ausreicht. Es scheint deshalb wahrscheinlich, daß unter dem Einfluß von DS eine quantitative oder auch qualitative Verbesserung des immunologischen Gedächtnisses hervorgerufen wurde.

Wir wissen heute, daß sowohl in der T-Zell- als auch in der B-Zell-Population immunologisches Gedächtnis lokalisiert ist (22,23,24). Ungeklärt ist jedoch die Frage, ob bei der Realisierung des immunologischen Gedächtnisses mehr qualitative oder mehr quantitative Vorgänge eine Rolle spielen (17). In

diesem Versuch ließ sich lediglich zeigen, daß die Gedächtnisleistung der Versuchsgruppe, die zusätzlich DS erhielt, proportional mit der Anzahl transferierter Milzzellen gegenüber der Gruppe, die nur das Antigen erhielt, zunahm.

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß Polyanionen und hier besonders DS die DNS-Synthese in den vom Knochenmark abstammenden Vorläuferzellen für die antikörperbildenden Zellen, den sogenannten B-Zellen, stimulieren (8). Demnach scheint es wahrscheinlich zu sein, daß in den vorliegenden Versuchen die DNS-Synthese der B-Zellen gefördert wurde. Andererseits konnte aber auch gezeigt werden, daß cortison-resistente Thymuszellen ebenfalls durch Polyanionen in ihrer DNS-Synthese stimuliert werden (9).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß Polyanionen sowohl die in der T-Zell- als auch die in der B-Zellpopulation vorhandenen Gedächtniszellen stimulieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Braun, W. and Nakano, M. : Antibody formation: Stimula-
tion by polyadenylic and poly-
cytidilic acids.
Science 157, 819 (1967)
2. Braun, W., Nakano, L., : Stimulation of antibody for-
Jaraskova, L., Yajima, Y. ming cells by oligonucleotides
and Jiminez, L. of known compositions.
In : Nucleic Acids in Immu-
nology
Edited by Pescia, O.J. and
Braun, W. 347 (1968)
3. Claman, H.N. and Chaperon: Immunological complementation
E.A. between thymus and marrow
cells- a model for the two-cell
theory of immunocompetence.
Transplant.Rev. 1, 92 (1969)
4. Claman, H.N., Chaperon, : Immunocompetence of trans-
E.A. and Triplett, R.F. ferred thymus-marrow combi-
nations.
J.Immunol. 97, 828 (1966)
5. Davies, A.J.S. : The thymus and the cellular
basis of immunity.
Transplant.Rev. 1, 43 (1969)
6. Diamantstein, T., Meinhold, : Stimulation of humoral antibody
H. and Wagner, B. formation by polyanions. 5. Re-
lationship between enhancement

6. of sheep red blood cell up-
take by the spleen and adju-
vant action of dextran sulfate.
Eur.J.Immunol. 1,429 (1971)
7. Diamantstein, T., Odenwald,: Stimulation of immune response
G. and Odenwald, D. by polymannuronic-guluronic
acid in mice.
Experientia 27, 953 (1971)
8. Diamantstein, T., Rühl,H. : 4. Arbeitstagung über Leuko-
Vogt, W. and Borchert, G. zytenkulturen "Lymphozyten-
funktion in vitro."
Stimulation of B-cells by poly-
anions.
Vortrag 30.-31.3.1973 Innsbruck
9. Diamantstein, T., Rühl,H. : Stimulation of lymphoid cells
Vogt, W. and Borchert, G. by polyanions
1. Target cells and possible
mode of action
Eur.J.Immunol. 1973 (im Druck)
10. Diamantstein, T., Wagner , : Zum Mechanismus der Stimu-
B., Beyse, I. and Oden- lierung der humoralen Antikör-
wald, M.V. perbildung durch Polyanionen.
Z.klin.Chem.u.klin.Biochem.
8. Jg. 632(Nov. 1970)
11. Diamantstein, T., Wagner , : Stimulation of humoral antibody
B., Beyse, I., Odenwald, formation by polyanions.
M.V. and Schulz, G. 1. The effect of polyacrylic acid
on primary response in mice

11. immunized with sheep red
blood cells.
Eur.J.Immunol. 1, 335 (1971)
12. Diamantstein, T., Wagner, : Stimulation of humoral antibody
B., Beyse, I., Odenwald, formation by polyanions.
M.V. and Schulz, G. 2. The influence of sulfate
esters of polymers on the
immune response in mice.
Eur.J.Immunol. 1, 340 (1971).
13. Eisen, H.N. and Siskind, : Variations in affinities of
G.W. antibodies during the immune
response.
Biochemistry 3, 996 (1964)
14. Jacobsen, E.B., L'Age- : Immunological Memory in Mice.
Stehr, I and Herzenberg, 2. Cell Interactions in the
A. Secondary Immune Response
Studied by Means of Immuno-
logical Allotype Markers.
J.Exp.Med. Vol. 131, 6, 1109
(1970)
15. Jerne, N.K., Nordin, A. : Cell Bound Antibodies .
A. Edited by Amos, B. and Ko-
prowski, H.
The Wistar Institute Press
Philadelphia 109 (1963)
16. Johnson, A.G., Cone, R.E. : Stimulation of the Immune
Friedman, H.M., Han, I. System by Homopolyribonucle-
H., Johnson, H.G., otides.

16. Schmidtke, I.R. and Stout, R.D. : In: Biological Effects of Polynucleotides.
Edited by Roland F. Beers and Werner Braun, Springer Verlag New York 157 (1971)
17. Katz, D.H. and Benacer-raf, B. : The Regulatory Influence of Activated T-Cells on B-Cell Responses to Antigen: 8.
Functions of T- and B-Lymphocytes in Various Immunological Phenomena.
In: Advances in Immunology Vol. 15. Edited by F.J. Dixon and Henry G. Kunkel
Academic Press New York and London 67 (1972)
18. Kielmann, J. : Untersuchung des Einflusses von Polyäthylensulfat auf die humorale Immunantwort bei der Maus.
Dissertation 1973 (in Vorbereitung)
19. L'Age-Stehr, J. and Herzenberg, L. : Immunological Memory in Mice
1. Physical separation and Partial Characterization of Memory Cells for Different Immunoglobulin Classes from Each Other and from Antibody Producing

19. : Cells.
J.Exp.Med., Vol.131 6,
1093 (1970)
20. Miller, J.F.A.P. and : Cell to cell interaction in
Mitchell, G.F. the immune response.1.
Hemolysin-forming cells
in neonatally thymectomized
mice reconstituted with
thymus or thorycic duct
lymphocytes.
J.Exp.Med. 128, 801 (1968)
21. Miller, J.F.A.P. and : Thymus and antigen reactive
Mitchell, G.F. cells.
Transplant.Rev. 1,43 (1969)
22. Mitchell, G.F., Chan, E.L. : Immunological Memory in
Noble, M.S., Weissman, I.L., Mice 3. Memory to Hetero-
Mishell, R.J. and Herzen- logous Erythrocytes in Both
berg, L.A. T Cell and B Cell Popula-
tions and Requirement for
T Cells in Expression of B
Cell Memory. Evidence Using
Immunoglobulin Allotype and
Mouse Alloantigen Theta Mar-
kers with Congenic Mice.
J.Exp.Med. 135, 165 (1972)
23. Mitchell, G.F. and Miller, : Immunological activity of
J.F.A.P. thymus and thoracic duct lym-
phocytes.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA
59, 296 (1968)

24. Raff, M.C. : Role of thymus-derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice.
Nature (London) 226, 1257 (1970)
25. Sabet, T., Newlin, C. and Friedman, H. : Effects of RES "blockade" on antibody formation.
Immunology 16, 433 (1969)
26. Sachs, L. : Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag Berlin 312 (1968)
27. Spiesel, S.Z. and Gershon, R.K. : Production and Temporary Suppression of Memory Cells during Tolerance Induction in T Cells.
Nature New Biol. 238, 271 (1972)
28. Stavitsky, A.B. : Micromethods for the study of proteins and antibodies.
J. Immunol. 72, 360 (1954)
29. Sterzl, J. and Jilek, M. : A model of differentiation of immunologically competent cells.
In: Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure, Vol. II. Edited by Sterzl, J. and Riha, I.
Academic Press New York and London (in Vorbereitung)

30. Taylor, R.B.

: Cooperation in the antibody
response of mice to two
serum albumins: specific func-
tion of thymus cells.
Transplatn.Rev. 1,114 (1969).

Herrn Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein
danke ich für das Thema und die freundliche
Anteilnahme am Zustandekommen dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name: Dietrich Theden

Geburtsdatum: 11.09.1944

Geburtsort: Konstanz

Vater: Dr. Klaus Theden,

Mutter: Gisela Theden, geb. Hefner

Schulen: 1951- 1959 Grundschule in Rhinow

1959- 1963 Erweiterte Oberschule in Rathenow,

1963 Abitur

Studium: 1964- 1966 Medizinstudium an der Medizinischen
Akademie in Magdeburg

1965 Vorphysikum

1966- 1968 Medizinstudium an der Freien Univer-
sität Berlin

1968 medizinisches Physikum

1968- 1972 Zahnmedizinstudium an der Freien
Universität Berlin

1969 zahnmedizinisches Physikum

1972 Approbation als Zahnarzt

1972/73 Tätigkeit als Assistenzzahnarzt

